

⑫ 公開特許公報(A)

平4-197182

⑬ Int. Cl.⁵

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 平成4年(1992)7月16日

C 12 N 15/57
 C 11 D 3/386
 C 12 N 9/54
 //(C 12 N 15/57
 C 12 R 1:07)
 (C 12 N 9/54
 C 12 R 1:07)

ZNA

7614-4H
 7823-4B

8717-4B C 12 N 15/00

A

審査請求 未請求 請求項の数 9 (全17頁)

⑮ 発明の名称 アルカリプロテアーゼY a酵素をコードするDNA及び該DNAを用いたアルカリプロテアーゼY aの製造方法

⑯ 特 願 平2-327110

⑰ 出 願 平2(1990)11月28日

⑱ 発 明 者 戸 部 聖 一 神奈川県中郡二宮町山西457
 ⑱ 発 明 者 大 寺 基 靖 神奈川県平塚市日向岡2-2-34
 ⑱ 発 明 者 浅 井 芳 男 神奈川県中郡二宮町百合が丘2-23-3
 ⑲ 出 願 人 ライオン株式会社 東京都墨田区本所1丁目3番7号
 ⑳ 代 理 人 弁理士 中 村 稔 外8名

明 細 書

1. 発明の名称 アルカリプロテアーゼY a酵素
 をコードするDNA及び該DNA
 Aを用いたアルカリプロテアー
 ゼY aの製造方法

2. 特許請求の範囲

- (1) アルカリプロテアーゼY a酵素をコードする
 DNA。
 (2) 下記のアミノ酸配列で特定される請求項1記
 載のDNA。

1 20
 AsnAspValAlaArgGlyIleValLysAlaAspValAlaGlnAsnAsnTyrGlyLeuTyr
 21 40
 GlyGlnGlyGlnLeuValAlaValAlaAspThrGlyLeuAspThrGlyArgAsnAspSer
 41 60
 SerMetHisGluAlaPheArgGlyLysIleThrAlaLeuTyrAlaLeuGlyArgThrAsn
 61 80
 AsnAlaSerAspProAsnGlyHisGlyThrHisValAlaGlySerValLeuGlyAsnAla
 81 100
 LeuAsnLysGlyMetAlaProGlnAlaAsnLeuValPheGlnSerIleMetAspSerSer
 101 120
 GlyGlyLeuGlyGlyLeuProSerAsnLeuAsnThrLeuPheSerGlnAlaTrpAsnAla
 121 140
 GlyAlaArgIleHisThrAsnSerTrpGlyAlaProValAsnGlyAlaTyrThrAlaAsn

141 160
 SerArgGlnValAspGluTyrValArgAsnAsnAspMetThrValLeuPheAlaAlaGly
 161 180
 AsnGluGlyProAsnSerGlyThrIleSerAlaProGlyThrAlaLysAsnAlaIleThr
 181 200
 ValGlyAlaThrGluAsnTyrArgProSerPheGlySerIleAlaAspAsnProAsnHis
 201 220
 IleAlaGlnPheSerSerArgGlyAlaThrArgAspGlyArgIleLysProAspValThr
 221 240
 AlaProGlyThrPheIleLeuSerAlaArgSerSerLeuAlaProAspSerSerPheTrp
 241 260
 AlaAsnTyrAsnSerLysTyrAlaTyrMetGlyGlyThrSerMetAlaThrProIleVal
 261 280
 AlaGlyAsnValAlaGlnLeuArgGluHisPheIleLysAsnArgGlyIleThrProLys
 281 300
 ProSerLeuIleLysAlaAlaLeuIleAlaGlyAlaThrAspValGlyLeuGlyTyrPro
 301 320
 SerGlyAspGlnGlyTrpGlyArgValThrLeuAspLysSerLeuAsnValAlaTyrVal
 321 340
 AsnGluAlaThrAlaLeuAlaThrGlyGlnLysAlaThrTyrSerPheGlnAlaGlnAla
 341 360
 GlyLysProLeuLysIleSerLeuValTrpThrAspAlaProGlySerThrThrAlaSer
 361 380
 TyrThrLeuValAsnAspLeuAspLeuValIleThrAlaProAsnGlyGlnLysTyrVal
 381 400
 GlyAsnAspPheSerTyrProTyrAspAsnAsnTrpAspGlyArgAsnAsnValGluAsn

401 420
ValPheIleAsnAlaProGlnSerGlyThrTyrIleIleGluValGlnAlaTyrAsnVal
421 433
ProSerGlyProGlnArgPheSerLeuAlaIleValHis

(3) 下記のDNA配列で特定される請求項1記載のDNA。

1 80
AATGATGTAGCAAGAGGATAGTAAAGCTGATGTTGCACAAACAATTACGGATTATAT
61 120
GGACAAGGTCAACTAGTTCAGTAGCGGACACAGCTTAGATACAGGTCGTAACGATAGT
121 180
TCTATGCATGAAGCATTCGCGCGGAAAAATCACAGCTCTTTACGCTTAGGAAGAATAAT
181 240
AATGCGAGTGATCCGAATGGCGTGCACACATGTAGCAGGTTCTGTACTTGTAATGCT
241 300
TTAAATAAGGAATGGCTCCGCAAGCTAACTAGTCTTCCAATCTATTATGGATACGAGC
301 360
GGAGGATTAGGTGGCTTACCATCGAAGCTAAATACGTTATTTAGTCAAGCTTGAATGCT
361 420
GGAGCAAGCAATTCATACTAACTCTTCCGAGCGCCAGTAAATGGAGGCTACACTGCTAAC
421 480
TCGAGACAAGTGGATGAGTATGTTCCAAATAATGATATGACGGTACTTTTTCACGCTGCT
481 540
AATGAAGGTCTAATTCAGGAACAATTAGTGTCCAGGTACAGCGAAAAATGCTATTACG

541 600
GTCCGCCCAACGAAAACTATCGCCCAAGCTTCGGTTCGATAGCAGATAACCCAAATCAT
601 660
ATTGCACAATTTTCATCGACAGGAGCTACGAGCGATGCACGAATTAAGCCTGACGTAACA
661 720
GCTCCTGGAACTTTATTTTATCAGCAGCTTCTTCTTACCTCCAGACTCTTCGTTTTGG
721 780
GCGAATTATAACAGTAAATACGCGTATATCGCGGTACCTCCATGGGACACCTATTGTT
781 840
GCAGGGGAATGTGCGCAATTACCTGAGCATTATATAAAAAATAGAGGTATTACTCCTAAG
841 900
CCTTCTTTAATAAAAGCTGCACCTTATCGCTGGTGTCTACTGATGTTGGTTAGGATACCT
901 960
ACTGCTGACCAAGGCTCGGCGCGTGTACTCTAGATAAATCGTTAAATGTAGCTATGTC
961 1020
AATGAAGCAACTGCATTAGCCACAGGACAAAAAGCAACGTATTCGTTCCAAGCACAAGCG
1021 1080
GGTAAACCTTTAAAAATCTCGTTAGTATGGACAGATGCTCCTGGAAGTACAACCTGCATCT
1081 1140
TATACACTAGTTAATGATTTAGATCTAGTTATTACTGCTCGAATGGACAAAAATATGTA
1141 1200
GGAAATGATTTTATGTTATCCTTATGATAAATACTGGCATGCTCCCAACATCTTGAGAAC
1201 1260
GTATTTATAAAGCTCGGCAATCTCGAAGCTATATAATTGAGCTTCAACCGTATAATGTA
1261 1299
CCATCTCGCCCAACGCTTTCTCACTAGCTATGCTACAT

- (4) 請求項1又は2のDNAの上流に、中性またはアルカリプロテアーゼ遺伝子の転写及び翻訳に関する5'末端の非翻訳領域又はアミラーゼ遺伝子の転写及び翻訳に関する5'末端の非翻訳領域を有する請求項1記載のDNA。
- (5) 請求項1～4のいずれか1項に記載のアルカリプロテアーゼY_a酵素をコードするDNAを含有するプラスミドDNA。
- (6) 請求項5記載のプラスミドDNAを導入した微生物。
- (7) 微生物がバチルス属細菌である請求項6記載の微生物。
- (8) 請求項6又は7記載の微生物を培養することにより培養物からアルカリプロテアーゼY_aを採取することを特徴とするアルカリプロテアーゼY_aの製造方法。
- (9) 微生物がバチルス属細菌であり、中性で培養する請求項8記載の製造方法。

3. 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

本発明は耐アルカリ性及び耐界面活性剤性に優れた、洗浄力の改善に寄与するY_a酵素（特開昭61-280278号）の遺伝子をコードするDNA断片及び核断片を含むプラスミドを導入した微生物を用いてY_a酵素を製造する方法に関する。

〔従来の技術〕

耐アルカリ性及び耐界面活性剤性に優れたY_a酵素は、通常のアルカリプロテアーゼが失活するような高pH液体洗浄剤に配合した場合でも、蛋白質分解活性を保持し、洗浄力の向上に寄与する能力を有している。Y_a酵素は、バチルス・エスピ― Y株（*Bacillus* sp. Y）（微工研菌寄第8088号）を培養することにより、その培養物に見いだすことができるが、通常の培養を行なってもその生産量は低くこの状態では工業的レベルでの計算は困難と言わざるをえない。

一般に、バチルス属が生産するアルカリプロテアーゼの生産性を向上させるためには、化学物質、

紫外線照射等による変異処理等を用いた菌株の育種や培養条件の改良等を行ない、生産性を向上させることが試みられている。ところが菌株または製造物の種類によってその効果の程度は様々であり、偶然性によるところが大きい。そこで合理的かつ理論的に生産性の高まる製造方法、すなわち遺伝子組換え技術を用いたY_a酵素の製造方法が望まれている。

また好アルカリ性細菌であるバチルス・エスピー Y株は、アルカリ性の培地で培養を行なうために、栄養源の変質や培養液の着色等の様々な不都合が生じる。そのため中性付近での培養が可能になれば、培養工程や精製工程の簡略化が可能となり工業生産において有利である。

〔発明が解決しようとする課題〕

Y_a酵素の生産性を高めるためには、バチルス・エスピー Y株を用いた従来の変異処理法を主体とした育種法では不十分な点がある。そこで本発明は、遺伝子組換え技術を用いることによりY_a酵素の生産性の向上に利用できるY_a酵素をコー

ドする遺伝子を提供すること、及び該遺伝子を用いてY_a酵素の生産性を向上させる方法を提供することを目的とする。

〔課題を解決するための手段〕

本発明は、Y_a酵素生産菌よりY_a酵素遺伝子を単離し、その塩基配列を決定することにより、又Y_a酵素遺伝子即ちY_a酵素のプロモーターからシグナルペプチド、前駆体領域、成熟酵素領域及びターミネーターまでをコードする領域を含むDNA断片を適当な宿主菌に導入することによりY_a酵素を生産し、さらにはプロモーター領域（以下、プロモーター領域とは一般的に大腸菌等で定義されるコンセンサス配列に加えて構造遺伝子の直前にあるShine-Dalgarno配列を含む転写及び翻訳に関与する5'末端非翻訳領域とする。）を、その宿主菌において効率よく作動するような他の遺伝子由来のプロモーター領域に置換することによりY_a酵素を高生産化できることを見出し、該知見に基づいて完成された。

本発明に係るY_a酵素遺伝子は、第1図に示す

塩基配列とアミノ酸配列を有する。この配列中には、転写、翻訳開始に関する領域、前駆体領域と成熟蛋白領域とが含まれ、このうち、203残基目～635残基目のアミノ酸配列が成熟タンパク質に相当し、本発明において重要である。つまり、本発明によれば上記203～635（成熟酵素領域）残基の上流に位置するプロモーター領域、分泌のための領域等を公知の手段により他の蛋白質をコードする遺伝子のそれらと置換し、より効率的にY_a酵素を製造することができる。この際、本発明では、203～635残基の上流に位置するプロモーター領域をバチルス属細菌で強力に機能するようなプロモーター領域をもった遺伝子、例えばバチルス属細菌由来の中性又はアルカリプロテアーゼ又はアミラーゼ遺伝子のプロモーター領域で置換したDNAをプラスミドに導入し、これをバチルス属細菌に導入することによって、中性領域（pH6～8近辺）で培養することによりY_a酵素を効率的に製造することができる。

第1図に示す塩基配列は、Y_a酵素遺伝子のク

ローニングにより決定できた。ここで用いるクローニング法としては、Y_a酵素をコードする遺伝子をクローニングできる方法であればいかなる方法でも構わないが、例えば下記に示すような大腸菌を宿主菌として、バチルス・エスピー Y株染色体のDNA断片を保持する組換え体を作製し、Y_a酵素をコードする遺伝子と相補的なDNAを利用したハイブリダイゼーション法によってY_a酵素遺伝子をクローニングすることができる。

Y_a酵素生産菌、例えばバチルス・エスピー Y株からY_a酵素を精製し、必要に応じてトリプシン消化等により得られたY_a酵素断片等を用いてアミノ酸配列を決定し、このうち好適なアミノ酸配列に対応する一本鎖オリゴヌクレオチドをDNAプローブとして合成することができる。

次に、Y_a酵素生産菌より染色体DNAを抽出する。用いる菌株としてはY_a酵素を生産する菌株であればいかなる菌株でも構わないが、例えばバチルス・エスピー Y株があげられる。染色体DNAを抽出する方法としてはサイトウーミウラ

の方法 (Biochim. Biophys. Acta, 72, 619 (1983)) 等によって調製することができる。

このように取得した染色体DNAをEcoRI、XbaIなどの制限酵素を用いて断片化し、アガロースゲル電気泳動に供し、合成したDNAプローブを用いてサザンハイブリダイゼーション (Molecular Cloning, 2nd Edit., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 9.31 (1989)) を行ない、DNAプローブの相補性及びその相補するDNA断片の大きさを特定する。染色体DNAを消化する制限酵素は、他の制限酵素であっても構わない。DNAプローブは γ - 32 P-ATPを用いることによって標識することができる。

次に特定したDNA断片を回収する。回収方法はどのような方法でも構わないが、例えばDBA3ベーパー法 (Molecular Cloning 2nd Edit., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 6.24 (1989)) を用いてそのDNA断片を回収することができる。

DNAを抽出し、前記と同様にサザンハイブリダイゼーションを行ない、DNAプローブと相補する組換えプラスミドを保持する菌株を選択することによりY_a酵素遺伝子を保持する形質転換株を取得することができる。

取得したY_a酵素遺伝子の塩基配列はSangerらの方法等 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463 (1977)) により決定することができる。さらにその塩基配列によってY_a酵素のアミノ酸配列を解明することができる。

本発明のDNA配列は天然のDNA配列のみに限定されるのではなく、本発明により明らかにされたY_a酵素のアミノ酸配列をコードする他のDNA配列も含まれる。また、本酵素の特徴である耐界面活性剤性及び耐アルカリ性等のY_a酵素の機能を損なわない限りにおいて本発明のDNA配列及びアミノ酸配列に人為的な挿入、欠失、置換等を行なうことにより改造することは可能であり、本発明にはそのような変異遺伝子及び改質酵素蛋白質も含まれる。

さらに回収したDNA断片とベクターDNAとを連結する。そのDNA断片を消化した制限酵素と同じ制限酵素認識部位を持つベクターDNA、例えばpBR328、pUC118などを同一の制限酵素で消化する。さらにアルカリフォスファターゼで脱磷酸したのち同一の制限酵素認識部位を有するDNA断片とT4リガーゼにより連結することができる。この反応物をHanahanの方法 (DNA Cloning Vol.1 IRL Press, p.109 (1985)) に準じて大腸菌に導入することができる。

形質転換を行なった菌株の中からY_a酵素遺伝子を保持する菌株を選択する。選択方法にはコロニーハイブリダイゼーション法 (Molecular Cloning 2nd Edit., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1.90 (1989)) 等、様々な方法を用いることができるが、例えば形質転換を行なった各菌株よりアルカリ-SDS法 (Molecular Cloning 2nd Edit., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1.25 (1989)) を用いて

Y_a酵素遺伝子を発現させるために、Y_a酵素遺伝子を適当な宿主菌に導入する。宿主菌としては、大腸菌、バチルス属、シェウドモナス (Pseudomonas) 属等の細菌、アスペルギルス (Aspergillus) 属、サッカロマイセス (Saccharomyces) 属、カンジダ (Candida) 属等の微生物があげられるが他の宿主菌でも構わない。例えばバチルス属を宿主菌とした場合、Y_a酵素遺伝子を分断することなく消化する制限酵素と同じ制限酵素でベクタープラスミド、例えばpUB110、pBD84等を消化し、これとY_a酵素遺伝子をT4リガーゼを用いて連結させる。この反応物をプロトプラスト法 (S. Chang, Mol. Gen. Genet, 188, 111 (1979)) を用いてバチルス属細菌に導入することができる。Y_a酵素遺伝子を含むDNAを導入した宿主菌を培養し、その培養物よりY_a酵素を取得する。Y_a酵素の発現の確認及びその発現量はウニスタン・プロテイン、蛋白質分解力の測定等により行なうことができる。

Y_a酵素の生産性を増大させるためには、プロモーター領域を宿主菌にとって効率のよいプロモーター領域と交換して発現させることにより、生産性を増大させることができる。例えばバチルス属細菌を宿主菌とした場合には、バチルス属細菌由来の中性またはアルカリプロテアーゼ遺伝子のプロモーター領域、アミラーゼ遺伝子のプロモーター領域等が好都合である。例えばY_a酵素遺伝子由来のプロモーター領域をバチルス・ライヘンホルミス(*Bacillus licheniformis*)由来のアミラーゼ遺伝子のプロモーター領域に交換する。そして、例えばプロモーター領域後方部分に部位特異的変異法を用いて制限酵素認識部位、例えばBclI認識部位等を作製し、制限酵素を用いたプロモーター領域の切除及びT4リガーゼを用いた連結等を行なうことによりプロモーター領域の交換を行なうことができる。さらにプロモーター領域の交換を行なったY_a酵素遺伝子をバチルス・サチルス(*Bacillus Subtilis*)に導入し、培養を行なうことによりY_a酵素を生産させる。これにより

もとのY_a酵素遺伝子由来のプロモーター領域を用いた場合に比べて生産性を増大させることができる。

上記に示す手法によりプロモーター領域を交換したY_a酵素遺伝子を含むプラスミドを保持するバチルス・サチルスを用いてY_a酵素の極めて高い生産性を獲得することができる。

上記バチルス・サチルスは、上記バチルス・サチルスが生産できる培地であればいずれでもかまわないが、例えば炭素源としてグルコース、澱粉、糖蜜等、窒素源としてはペプトン、ポリペプトンS、大豆粉、コーンステイプリカー等、さらにミネラル等を含む培地を用いて温度30-40℃、50-100時間培養することができる。また培養物から陰イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過等により、Y_a酵素を精製できる。

以下に実施例をあげて本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

[実施例]

実施例 1

サザンハイブリダイゼーション

Y_a酵素のN末端領域のアミノ酸配列をアブライド・バイオ・システムズ社(ABI社)製プロテインシーケンサー377Aを用いて決定した。結果は以下に示す通りであった。

N'-AsnAspValAlaArgGlyIleValLysAlaAspValAla
GlnAsnAsnTyrGly

Y_a酵素の中央部ないしC末端領域のアミノ酸配列を解析するため、トリプシン消化により得られた試料を用いて同様の操作を行なった。その結果を以下に示す。

N'-LysTyrAlaTyrMetGlyGlyThrSerMetAlaThr

これらの解析結果よりイノシン法に基いて以下に示すオリゴヌクレオチドDNAをABI社製DNA合成装置381Aを用いて作製した。

A A T

プローブN: 5' CCATA TT TT TGIGCIACATCIGC 3'

G G C

A T

プローブC: 5' GTTCCICCCATATAIGC TA TT 3'

G C

上記プローブについては、γ-³²P-dATP(アマシム社製)及びT4ポリヌクレオチドキナーゼ(宝酒造社製)を用いて5'末端を³²Pで標識した。

バチルス・エスピー Y株をNa₂CO₃ 10g/lを含むブイヨン培地(極東製薬社製)200mlを含む坂口フラスコに接種し、30℃で終夜培養した。菌体約2gを取得し、サイトウーミウタの方法に準じて染色体DNAを2.8mg調製した。このDNA10μgをEcoRI(制限酵素はすべて宝酒造製)またはXbaIで消化後アガロースゲル電気泳動に供し、先に調製したプローブNを用いてサザンハイブリダイゼーションを行なった。その結果、EcoRIで消化した染色体DNA断片では、約2.8KbpのDNA断片が、またXbaIで消化した断片では約1.2KbpのDNA断片がハイブリダイズした。さらに同操作をプローブCにつ

いても行なったところ、EcoRIで消化した染色体DNA断片では約2.0 KbpのDNA断片が、またXbaIで消化した断片では約1.2 KbpのDNA断片がハイブリダイズした。

クローニング

前述の染色体DNA 200 μ gをEcoRIで消化後アガロースゲル電気泳動に供し、約2.8 KbpのDNA断片をDEAEペーパー法を用いて20 μ g回収した。また約2.0 KbpのDNA断片についても同様の操作を行ない20 μ g回収した。染色体DNA 200 μ gをXbaIで消化し同様の操作を行ない約1.2 KbpのDNA断片を10 μ g回収した。pBR328(ペーリンガー社製)1 μ gをEcoRIで消化しアルカリフォスファターゼ(ペーリンガー社製)で脱磷酸後、フェノール抽出、すなわちフェノール-クロロホルム混液(1:1)を加え蛋白質変性を行ない、遠心分離後上清を回収する操作を行なった。さらにエタノール沈殿、すなわち0.1倍量の3M酢酸ナトリウム(pH4.8)及び2倍量のエタノールを加え-80

で10分冷却後遠心分離によりDNAを回収する操作を行なった。このうち0.2 μ gと前述の約2.8 KbpのEcoRI断片0.05 μ gをライゲーションキット(宝酒造社製)を用いて連結した。この反応物をハナハンの方法に準じて大腸菌HB101株に導入した。生育した形質転換体500株よりアルカリ-SDS法を用いてDNAを抽出し、前記のプロープNを用いてサザンハイブリダイゼーションを行なった。その結果プロープNとハイブリダイズするプラスミドpYT101

(第2図)を見だし、そのプラスミドを保持する菌株を取得した。さらに約2 KbpのEcoRI断片についても前述のプロープCを用いて同様の操作を行ない、プロープCとハイブリダイズするプラスミドpYB2(第3図)を見だし、そのプラスミドを保持する菌株を取得した。また、pUC118(宝酒造社製)1 μ gをXbaIで消化しアルカリフォスファターゼで脱磷酸後、フェノール抽出、エタノール沈殿を行なった。このうち0.2 μ gと前述の約1.2 KbpのXbaI断片0.05 μ gを

ライゲーションキットを用いて連結し、同様の操作をプロープNを用いて行なった。その結果プロープNとハイブリダイズするプラスミドpYX1(第4図)を見だし、そのプラスミドを保持する菌株を取得した。

塩基配列の決定

取得したプラスミドpYT101、pYB2及びpYX1のYa酵素遺伝子の一部をpUC118及びpUC119(宝酒造社製)にサブクローニングし、宝酒造社製のマニュアルに従って1本鎖DNAを調製した。この1本鎖DNAと α -³²S-dCTP(アマシヤム社製>37TBq/ μ mol)及びSEQUENASE(東洋紡社製)を用いて塩基配列の決定を行なった。この結果得られた塩基配列を第1図に示す。218 bpから2122 bpに存在するオープン・リーディングフレームより解明されたアミノ酸配列には、前述のYa酵素のプロモーションクエンサーによるアミノ酸配列の解析により確認されたアミノ酸配列と一致する配列が203残基目からと448残基目からに見いだせる。ま

たN末端が203残基目から始まることから、翻訳開始から202残基目までが前駆体領域であり、203残基目以降が成熟酵素を構成する領域と判断される。

実施例 2

プロモーターの取得

バチルス・ライヘンホルミスLB8907株をブイヨン培地200 mlを含む坂口フラスコに接種し、30℃で overnight 培養を行ない、菌体約1 gを取得し、サイトウ・ミウラの方法に準じて染色体DNAを2.0 μ g調製した。このうち50 μ gをEcoRIで消化し、フェノール処理、エタノール沈殿を行なった。pUC118 1 μ gをEcoRIで消化後アルカリフォスファターゼを用いて脱磷酸し、フェノール処理、エタノール沈殿を行ない、このうち0.2 μ gと染色体DNAのEcoRI断片0.05 μ gをライゲーションキットを用いて連結し、この反応物をハナハンの方法に準じて大腸菌JM109株に導入した。生育した形質転換体を1%サツマイモデンプン(純正化学社製)を含む

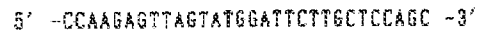
L培地(バクトトリプトン10g/l、バクトイーストエキス5g/l、NaCl5g/l、バクトアガー20g/l、アンピシリン100μg/l、pH7.2)に接種し37℃で約40時間培養した。その結果形質転換体2000株より、デンプンを分解する、即ちアミラーゼ遺伝子を有する菌株を1株取得した。この菌株が保持するプラスミドpTA1(第5図)のプロモーター領域の塩基配列を実施例1に準じて決定し、その結果を第6図に示す。

Y_a酵素を発現しうるプラスミドの作製

プラスミドpYB2 50μgをEcoRI及びSphIで消化しDEAEペーパー法を用いて約2KbpのDNA断片を回収した。そのうち0.05μgと、あらかじめEcoRI、SphIで消化しアルカリフォスファターゼを用いて脱磷酸処理後、フェノール処理、エタノール沈澱を行ない回収したpUC118 0.2μgをライゲーション・キットを用いて連結した。この反応物をハナハンの方法に準じて大腸菌JM109株に導入した。生

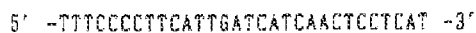
育した形質転換体の中から第7図に示すpUC118ESを保持する菌株を取得した。pYT101 50μgをEcoRIで消化しDEAEペーパー法を用いて約2.7KbpのDNA断片を回収した。そのうち0.05μgと、あらかじめEcoRIで消化しアルカリフォスファターゼを用いて脱磷酸処理後、フェノール処理、エタノール沈澱を行ない回収したpUC118ES 0.2μgをライゲーション・キットを用いて連結した。この反応物をハナハンの方法に準じて大腸菌JM109株に導入し、生育した形質転換体の中から第7図に示すpTB3を保持する菌株を取得した。

ABI社製DNA合成装置281A型を用いて下記に示すDNAプローブ(第1図の1181-1210bpに対応)を合成し、



宝酒造社製部位特異的変異法キットMutan-Kを用いて、pTB3のY_a酵素のアミノ酸配列を変えずに塩基配列を改変し、EcoRI部位を消失させたプラスミドpTB3Eを取得した。さらに下記

に示すDNAプローブ(第1図の200-229bpに対応)を合成し、



同様にして塩基配列を改変し、Y_a酵素翻訳開始コドン上流にBclI認識部位を作製したプラスミドpTB3EBを取得した。

また下記に示すDNAプローブを合成し、(第6図の216-245bpに対応)を合成し、



同様にしてpTA1の塩基配列を改変し、プロモーター領域下流にBclI認識部位を持つプラスミドpTA1Bを作製した。

pUC118 1μgをEcoRIで消化しアルカリフォスファターゼで脱磷酸後、フェノール処理、エタノール沈澱を行ない回収した。このうち0.2μgとあらかじめEcoRIで消化し、フェノール処理、エタノール沈澱を行い回収したpUB110 0.05μgをライゲーションキットを用いて連結した。この反応物をハナハンの方法に準じて大腸菌JM109株に導入した。生育した形

質転換体の中から第8図に示すプラスミドpUB81を保持する菌株を取得した。pTB3E 5μgをEcoRIで消化し、フェノール処理、エタノール沈澱を行なった後、クレノウフラグメント(宝酒造社製)を用いてDNA末端を平滑化した。さらにフェノール抽出、エタノール沈澱を行い、このうち0.2μgとSphIリンカー(ニューイングランドバイオラブ社製)50ngをライゲーションキットを用いて連結した。この反応物をハナハンの方法を用いて大腸菌JM109株に導入した。生育した形質転換体のうちSphI認識部位が新たに作製されたプラスミドpTB3ES(第8図)を保持する菌株を取得した。pTB3ES 50μgをSphIで消化し、DEAEペーパー法を用いて4.6KbpのDNA断片を回収した。このDNA断片0.05μgと、SphIで消化し、フェノール抽出、エタノール沈澱を行なったpUB81 0.2μgとをライゲーションキットを用いて連結した。この反応物をプロトプラスト法を用いてパチルス・サチルス1012株に導入した。生育し

た形質転換体のうち第8図に示すプラスミド pUB 8 Y を保持する菌株を取得した。

pTA1B 50 μ g を EcoRI 及び BclI で消化し、DEAE ペーパー法を用いて約 1 Kbp の DNA 断片を回収した。pTB3EB 1 μ g を EcoRI 及び BclI で消化しアルカリフォスファターゼで脱磷酸後、フェノール抽出、エタノール沈澱を行ない回収した。このうち 0.2 μ g と前記の pTA1B 由来の 1 Kbp DNA 断片 0.05 μ g とをライゲーション・キットを用いて連結した。この反応物をハナハンの方法に準じて大腸菌 JM 109 株に導入した。生育した形質転換体のうち第9図に示すプラスミド pAY1 を保持する菌株を取得した。

pAY1 50 μ g を SphI、さらにベクター側のフラグメントを分断するため XmnI で消化し、DEAE ペーパー法を用いて約 3.5 Kb の DNA 断片を回収した。pUB8 1 μ g を SphI で消化しアルカリフォスファターゼで脱磷酸後、フェノール抽出、エタノール沈澱を行ない回収した。

を遊離させる酵素量を 1 アルカリプロテアーゼ単位 (APU) とした。各培養上清のアルカリプロテアーゼ活性の結果を表-1 に示す。pUB8 Y を保持する形質転換体のアルカリプロテアーゼの生産量は、pUB110 を保持する形質転換体に比べて約 3 倍高く、また pUB8 A を保持する形質転換体は、pUB8 Y を保持する形質転換体に比べて約 30 倍の高い Y_a 酵素の生産性を示した。

このうち 0.2 μ g と前述した pAY1 由来の 3.5 Kb DNA 断片 0.05 μ g をライゲーションキットを用いて連結した。この反応物を、プロトプラスト法を用いてバチルス・サチルス 1012 株に導入した。生育した形質転換体のうち第9図に示すプラスミド pUB8 A を保持する菌株を取得した。

Y_a 酵素の発現

pUB110、pUB8 Y、pUB8 A を保持するバチルス・サチルス 1012 株の形質転換体を以下に組成を示す培地 (溶性澱粉 90 g/l、ポリペプトン S (大五栄養社製) 50 g/l、K₂HPO₄ 5 g/l、MgSO₄ · 7H₂O 0.2 g/l、硫酸カナマイシン 50 mg/l、pH 7.5) を含む坂口フラスコに接種し 33℃ にて 90 時間培養した。培養上清のアルカリプロテアーゼ活性はアンソニー・萩原の法 (Hagiwara, B., J. Biochem. 45, 188 (1958)) に準じて測定した。すなわち 35℃、pH 10.5 の条件下で 10 分間反応し、1 分間にチロシン 1 μ g 相当量

表 1

	APU/ml
Bacillus subtilis 1012 (pUB8Y)	850
(pUB8A)	25400
(pUB110)	320

4. 図面の簡単な説明

第1図は、Y_a 酵素遺伝子の構造遺伝子領域の塩基配列およびそれに対応するアミノ酸配列である。

第2図は、Y_a 酵素遺伝子のうち構造遺伝子の N 末端側及びプロモーター領域を保持するプラスミド pYT101 の制限酵素切断地図である。

第3図は、Y_a 酵素遺伝子のうち構造遺伝子 C 末端側及びターミネーター領域を保持するプラスミド pYB2 の制限酵素切断地図である。

第4図は、Y_a 酵素遺伝子のうち構造遺伝子中央部を保持するプラスミド pYX1 の制限酵素切

断地図である。

第5図は、バチルス・ライヘンホルミスLB8907より単離したアミラーゼ遺伝子を保持するプラスミドpTA1の制限酵素切断地図である。

第6図は、バチルス・ライヘンホルミスLB8907より単離したアミラーゼ遺伝子のプロモーター領域近傍の塩基配列およびそれに対応するアミノ酸配列である。

第7図は、pYT101とpYB2のYa酵素遺伝子の領域を連結したプラスミドpTB3の作製行程図である。

第8図は、pTB3のうちYa酵素遺伝子の領域をバチルス属細菌で複製可能なプラスミドpUB110に連結したプラスミドpUB8Yの作製行程図である。

第9図は、pTB3EBのYa酵素遺伝子のプロモーター領域をpTA1Bのアミラーゼ遺伝子のプロモーター領域に交換し、バチルス属細菌で複製可能なプラスミドpUB110に連結したプラスミドpUB8Aの作製行程図である。

Ba : BamH I Bc : Bcl I
Bg : Bgl I I C : Cla I
E : EcoR I H : Hinc I I
K : Kpn I P : Pst I
S : Sph I Xb : Xba I
Xm : Xma I
AP : アルカリフォスファターゼ
MCS : マルチクローニングサイト
A^r : アンピシリン耐性遺伝子
T^r : テトラサイクリン耐性遺伝子
ori : 複製領域。

図面の傍書

第1図 Ya酵素遺伝子塩基配列とアミノ酸配列 (その1)

```

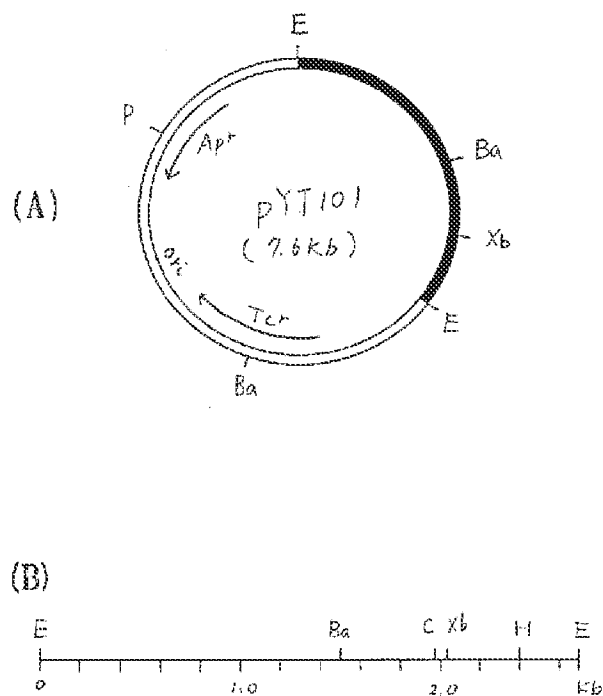
GCATCACTACATTTGGCTAAAGCTCTCTAGCCCTGTTCTTGAAGCAACATGGCTTTT 64
1
TTCTTTAACTAATGCTGATCTCTTTTCCATTGGCAATACGAGCAAAAAGCATTCGTATGC 65
85
AATGTAATGACTGAATTTTCCCAATACCGAAGAGGTTTCTCTATGCTATCTTATTATGATG 130
131
1
MetLysGlyLysLysAlaValValLeuSerValValAlaSerAla 15
AACATGAGGAGTTGAGCAGCAATGCAAGGGGAAAGACGACTCTATCATGAGTCTGCTCT 262
197
16
AlaIleLeuAlaSerValIleValIleSerSerProThrSerGlyAlaAspPheGlnValIleAsn 37
GCCATTTAGCTGCTATGCTTACTTCACTCACTAGTGGGACAGATTTTCACACTCAATTTTAA 263
269
38
GlyValLysSerLeuGlnAsnIleSerLeuValLysProIleSerSerGlyGluAlaSerPheLeu 59
GGCTCAAAAGCTTTACAAATGCTAGTTTGGTTAAACCATAGTAGCGGTGAGCCATGCTTTCTA 329
329
60
ValAspThrGluAsnIleAsnIleProLysGlyIleGlnLysLysLeuGluAlaValGlnLysAsp 81
CTACATACGGAATATTATATTCTTAAGCTATTCAAGAAAGAGCTAGACAGCTACACAGCAT 394
395
82
AsnGluLeuGlyIleValGlnPheThrGlyProIleSerGluGluGluArgLysGlyLeuGluSer 163
AACCACTCTACATCTACATTTATTCGACCAATTTCAGACAGACAGACGCAAGCATTTAGCTCT 526
461
104
LeuGlyValSerIleLeuAspThrValProAspPheIleValGlnIleThrSerGlyAlaThr 125
CTAGCACTATGCTATGATTTCTTCAGATTATGCTTTTATTTCTTCAGTATAGTGGTCTACA 592
527
128
LysAsnIleSerThrLeuIleSerValGluAsnValGlnProPheLeuProLeuTyrLysIleAsp 147
AAAAATATACCTACTTACTTCTCTGACAGACGACACCAATTTTACCATATATATAAATTGAT 583
583

```

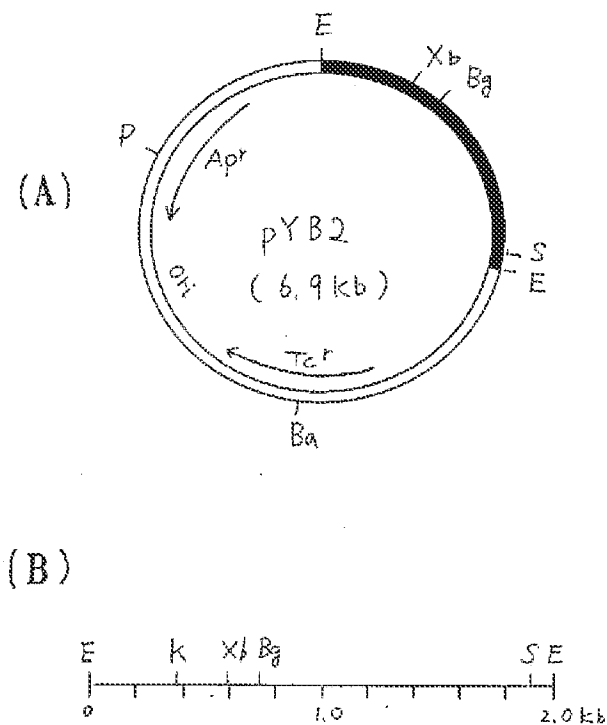

図面の浄書

第 1 図 Y 酵素遺伝子 塩基配列とアミノ酸配列 (その4)

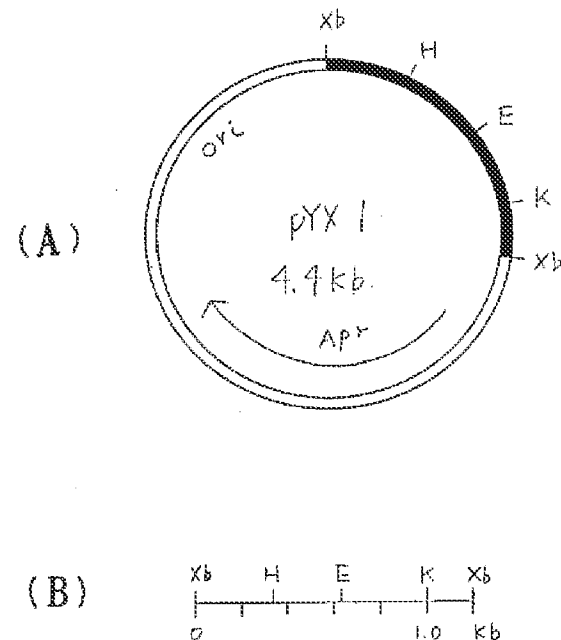
588	TyrProTyrAspAsnAsnTrpAspGlyArgAsnValGluAsnValPheIleAsnAlaProGln	609
1979	TATCTTATGATTAATTAATTCGGATCTCCACACAATGTTGAGACCTATTATTAAAGCTCTCGAA	2044
610	SerGlyThrTyrIleIleGluValGlnAlaTyrAsnValProSerGlyProGlnArgPheSerIleu	631
2045	TCTGCAAGCTATATATTGACGTTTCAGCGTATATGTACCATCTGCGCCACAGCGTTTCTCCTACTA	2110
632	AlaIleValHis	635
2111	GCTATGCTACATTATATATTTTATATGACAGAAAGACTAGGATTTTCACCTTAGTTTTCCTCA	2178
2177	TTTGTTCACCATATATATTTTTCACGACATATGCAAGCTA	



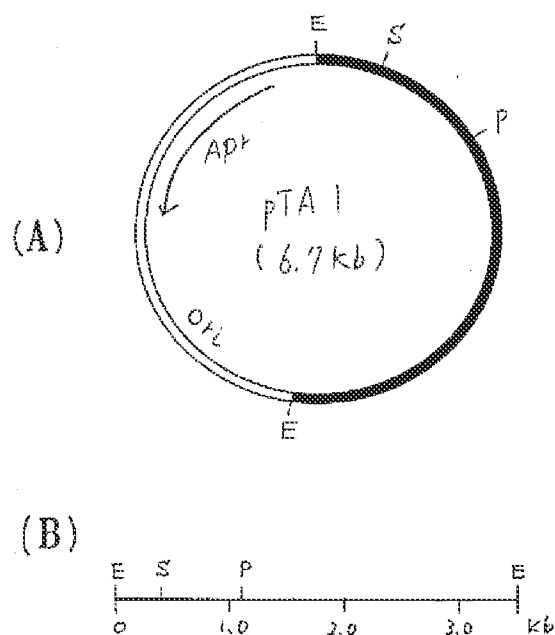
第 2 図



第 3 図



第 4 図

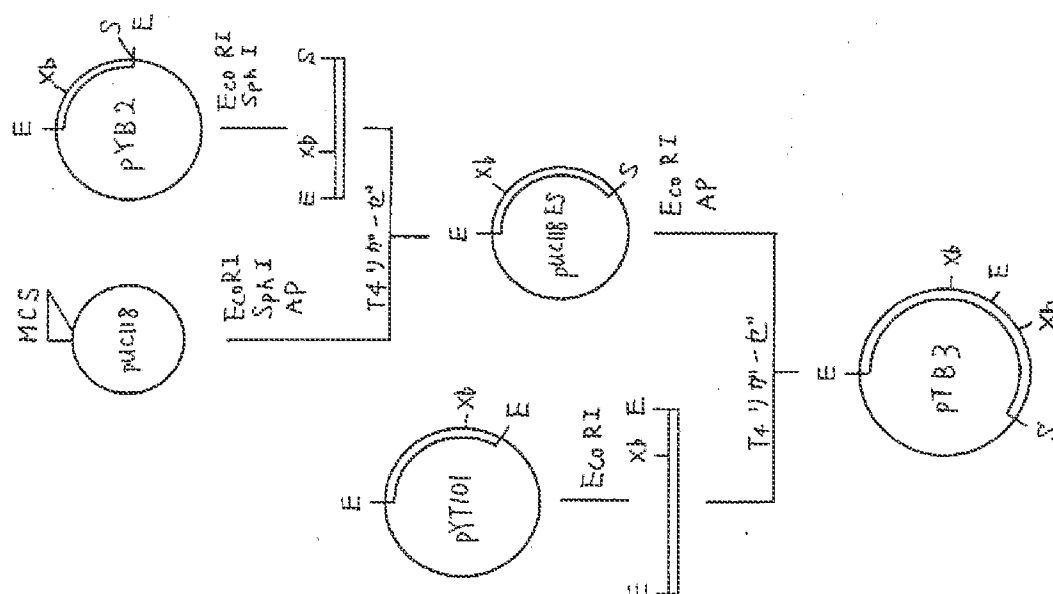


第 6 図 アミラーゼ・プロモーター遺伝子の塩基配列

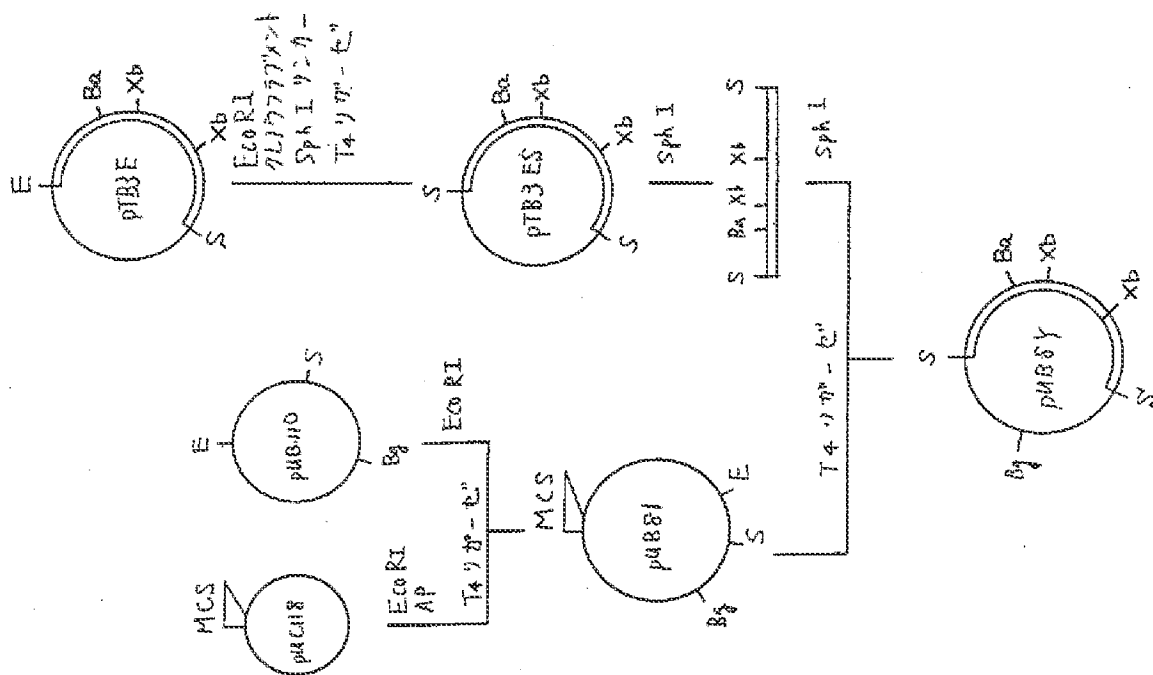
```

CAACGTCGCACATGCTGCTGAAGACATTATTAAGAGCTGAAAGCAAAAGGCTATCAATT
1                               80
GGTAAGTGTATCTCAGCTTGAAGCAAGTGAAGAACGAGAGGCTATTCAATAAATGACTA
81                               120
GAAAGCGCCATATCGCTTTTCTTTTGAAGAAAATATAGGCAAAATGCTATTTGTTAAAA
121                               180
                               1 2
                               MetLys
ATTCTGAATATTTATACAATATCATATGTTTCACATTGAAAGGGGAGGAGAAATCATGAAA
181                               240
3
GlnGlnLysArgLysTyrAlaArgLeuLeuProLeuLeuPheAlaLeuIlePheLeuLeu
CAACAAAAACGGCTTTACGCGCGATTGCTGCCGCTGTTATTTGGGCTCATCTTTGCTG
241                               300
34      37
ProHisSerAla
CCTCATTCTGCA
301      312
    
```

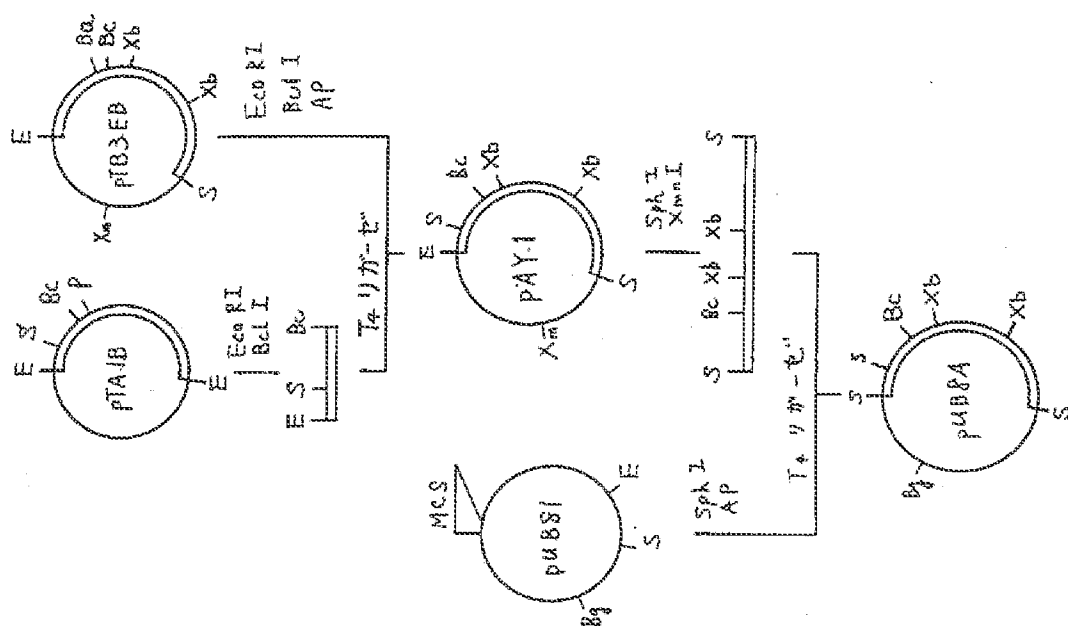
第 5 図



第 7 図



第 8 図



第 9 図

手続補正書(方式)

平成 3. 8. 27 月 日

特許庁長官 植松 敏 殿

1. 事件の表示 平成2年特許願第327110号

2. 発明の名称 アルカリプロテアーゼY_a酵素をコードするDNA及び該DNAを用いたアルカリプロテアーゼY_aの製造方法

3. 補正をする者

事件との関係 出願人

名称 (676) ライオン株式会社

4. 代理人

住所 東京都千代田区丸の内3丁目3番1号
電話(代) 3211-8741

氏名 (5985) 井理士 中 村

5. 補正命令の日付 平成3年3月12日

6. 補正の対象 図 面

7. 補正の内容

図面の第1図の(その2)、(その3)及び(その4)を別紙の通り補正する。

手続補正書

平成 3. 8. 27 月 日

特許庁長官 植松 敏 殿

1. 事件の表示 平成2年特許願第327110号

2. 発明の名称 アルカリプロテアーゼY_a酵素をコードするDNA及び該DNAを用いたアルカリプロテアーゼY_aの製造方法

3. 補正をする者

事件との関係 出願人

名称 (676) ライオン株式会社

4. 代理人

住所 東京都千代田区丸の内3丁目3番1号
電話(代) 3211-8741

氏名 (5985) 井理士 中 村

5. 補正命令の日付 自 発

6. 補正の対象 明細書の発明の詳細な説明の欄
図 面

7. 補正の内容

(1) 明細書の以下の箇所を以下の通り補正する。

頁	行	誤	正
6	下から4	計算	生産
11	10	染色体菌	染色体
15	下から2	Subtilis	subtilis
16	12	コーンステイ ープリカー	コーンステイ ンプリカー
21	下から 4~3	プロネンシー クエンサー	プロティンシー クエンサー

(2) 図面の第1図(その2)、第4図(その4)、第6図及び第9図を別紙の通り補正する。

第 1 図 Y 酵素遺伝子塩基配列とアミノ酸配列 (その2)

146	189
ProGluLeuLeuThrLysGlyAlaSerGlnLeuValGlnAlaValIleLeuAsnThrLysIleGln	
CCTGAGCTTTAAAGAAAGCTGCTCCAGCTGTTTCAGCGCTTAATTTAAATACAAACACCAA	
658	724
170	191
AsnLysAsnMetLysPheThrGlyLeuAspGluIleValGlnTyrAlaAlaAsnAspValIleu	
ATAAACAATCAATTTACCGGTTAGATGAGATGCTTCATATCTTCAATATATATATGCTGCT	
724	780
182	213
TyrIleSerProLysProGlnTyrGlnLeuPheIleAsnAspValAlaArgGlyIleValLysAlaAsp	
TATATATCAACCAAGCCCGAGATATGACTAATGAAATGATGACAGAGGATACATAAAGCTGAT	
791	856
214	235
ValAlaGlnAsnAsnTyrGlyLeuTyrGlyGlnGlnLeuValAlaValAlaAspThrGlyLeu	
GTTCCAAACAAATTTACGGATTATATGCAAGCTCACTAATGCTACTAGCGGACACAGCTTA	
857	922
226	257
AspThrGlyAlaAsnAspSerSerMetAlaGlnAlaPheArgGlyLysIleThrAlaLeuTyrAla	
GATACAGCTGCTACGATAGCTTATAGCATGAGCATTCGCCGGGAAATACAGCTCTTTACGGC	
923	988
258	279
LeuGlyArgThrAsnAsnAlaSerAspProAsnGlyIleGlyThrIleValAlaGlnLysValLeu	
TTAGGAGAGCAATTAATCCGACTGATCCGATGCCATGCCATGCCACACATGACAGGCTTCGTACTT	
989	1054
301	
GlyAsnAlaLeuAsnLysGlyMetAlaProGlnAlaAsnLeuValPheGlnSerIlePheLysSer	
GCTAATGCTTTAAATAAAGGAATGCTCCGCAAGCTAACTTACTGCTTCCAACTATATATGATAGC	
1055	1125
302	323
SerGlyGlyLeuGlyGlyLeuProSerAsnLeuAsnThrLeuPheSerGlnAlaIleProAsnAlaGly	
ACCGGAGGATTACGTGCTTACCATCATCACTTAATATGCTTATTTAGTCANCGTTGGATGCTGCA	
1126	1186
324	345
AlaArgIleIleThrAsnSerTyrGlyAlaProValAsnGlyAlaTyrThrAlaAsnSerArgGln	
GCAAGATTCATCACTAATCTTCCGAGCGCCGCTMAATGAGGCTGACACTGCTTAATCCAGACAA	
1187	1252
346	367
ValAspGluTyrValArgAsnAsnAspPheThrValIleuPheAlaIleGlyAsnGluGlyProAsn	
GTGATGACTATGTCGAATATATGATATGACCGTACTTTTTCGACTGCTTAATGAGCTCTTAAT	
1253	1318

第 1 図 Y 酵素遺伝子塩基配列とアミノ酸配列 (その1)

GGATCCACTACATTTTGGTAAAGTCTCTAGCGCTTCTTCTTCAAGCAACAATGGCTTTT	
1	64
TTGTTTTAACTAATATGCAATCTTTTTCATTCCGAAATACGAGGAAAAAGCAATCGTATAC	
65	130
AATGTAATACACTCAATTTTCCAAATACCGAGAGCTTTCTCTATGCTATCTTATTAAATGATG	
131	196
1	15
MetLysGlyLysLysArgValValIleuSerValValAlaIleSerAla	
AAGATGAGGAGTTGACAGAAATCAAGCGGAAAAAAGAGTAGTCTATCATAGTAGTTGCTCGCT	
197	262
16	37
AlaIleLeuAlaSerValMetValSerSerProThrSerGlyAlaAspPheGlnValAsnPheAsn	
GCAATCTTACGTCATATATGCTTAGTTCACCAACTATTCGGCCAGATTTTCAAGTGAATTTAAAT	
263	328
38	59
GlyValLysSerLeuGluAsnAlaSerLeuValLysProIleSerSerGlyGluAlaSerPheLeu	
GGTGCAAAAGCTTACAAATGCTACTTTGCTTAAAGCCATAAGTAGCCGTCAGGCATCTTTCTA	
329	394
60	81
ValAspThrGluAsnIleAsnIleProLysGlyIleGlnLysLysLeuGluAlaValGlnLysAsp	
GTAGATACCGAAATATATATATCTTCTTAAAGCTATTCAAAGAGCTAGAACCCAGTACAGAGGAT	
395	460
82	103
AsnGluLeuTyrIleValGlnPheThrGlyProIleSerGluGlnGluArgLysGlyLeuIleSer	
AACCAACTTACATCTTCAATTTACTGCKCAATTCAGAGGAGAGCCGAAAGCAATTAGAGTCT	
461	526
104	125
LeuGlyValSerIleLeuAspTyrValProAspTyrAlaPheIleValGlnTyrSerGlyAlaThr	
CTAGAGTATGCTTCTTACATTTATGTTCCAGATTAAGCTTTTATTGCTTCACTATAGTGGCTTACA	
527	592
126	147
LysAsnIleSerThrLeuIleSerValGluAsnValIleProPheLeuProLeuTyrLysIleAsp	
AAAATATATAGTACTTTACATTTCTGTCGAGAGGACACACCAATTTTACCATATATATAATGAT	
593	658

第 1 図 Y 酵素遺伝子 塩基配列とアミノ酸配列 (その3)

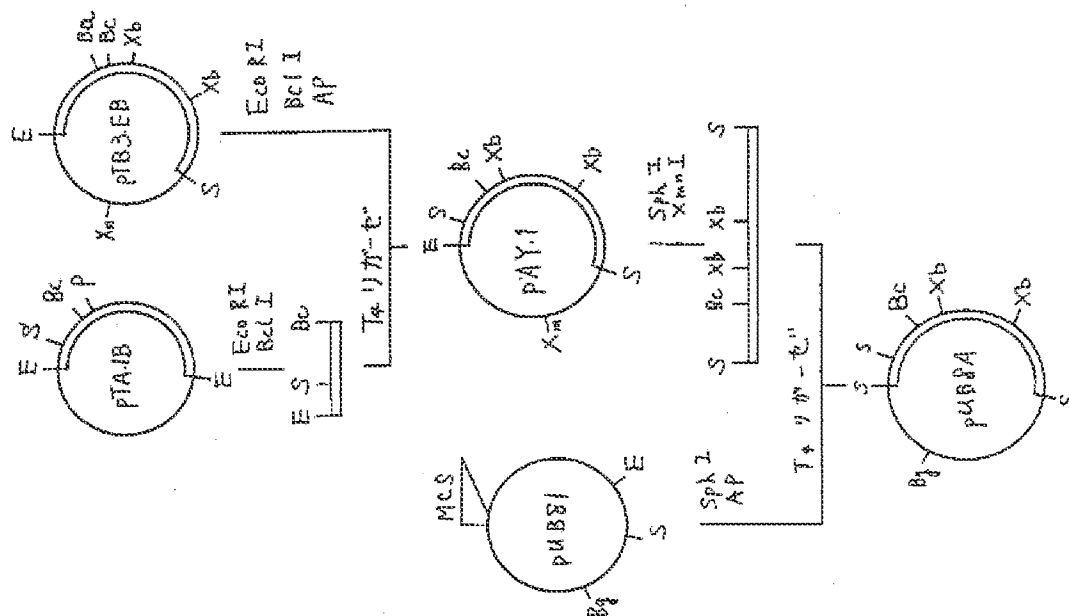
388	SerGlyThrIleSerAlaProGlyThrAlaIleValAsnAlaIleThrValGlyAlaThrGluAsnTyr	398
1319	TCCGACAAATTAGTCTCCAGGTACAGCGAATAATGCTATTACGGTCGGCCCAACGGAATACTAI	1384
390	ArgProSerPheGlySerIleAlaAspAsnProAsnIleIleAlaIlePheSerSerArgGlyAla	411
1319	CGCCAGCTTCGGTCGATACGATACCAATATATATTCACAAATTTTCATCAGCAGAGAGCT	1384
412	ThrArgAspGlyArgIleLysProAsnValIleAlaProGlyThrPheIleLeuSerAlaArgSer	439
1451	ACGAGGATGACGATTAAGCTGACGATACAGCTCTCGGACATTTATTTATCAGCAGCTTCT	1516
440	SerLeuAlaProAspSerSerPheIleAlaAsnProAsnSerLysTyrAlaTyrPheIleGlyThr	455
1487	TCCTTAGCTCAGACTTCCTTTTGGGGAATATATACAGTAAATACGCTATATGGCGGTACC	1582
456	SerHelaIleThrProIleValAlaGlyAsnValAlaGlnLeuArgGluHisPheIleLysAsnArg	477
1583	TCCATGGCGACAGCTATTGTTCCAGGAAATGTCGCCAATTACCTGACCATTTTATAAAAATAGA	1648
478	GlyIleThrProLysProSerLeuIleLysAlaValLeuIleAlaGlyAlaThrAspValGlyLeu	499
500	CGTATTACTCTAAAGCTCTTTTATTAAGCTGCACTTATCTCCGCTGCTACTGATCTTCTTTA	521
1714	GlyTyrProSerGlyAspGlnGlyTyrGlyArgValIleLeuAspLysSerLeuAsnValAlaTyr	1714
522	GCATATCTCTAGTCTGACCAAGCTGGCGGCTGCTTACTCTACATAAATGCTTAAATCTAGCTAT	1760
544	ValAsnGluAlaThrAlaLeuAlaThrGlyGlnLysAlaThrTyrSerPheGlnAlaGlnAlaGly	563
1781	GTCATGAGCAACTGCATTACCCAGGACCAAAAACAAAGCTATTCTCTCCAGCACAACAGCTGCT	1846
565	LysProLeuLysIleSerLeuValIleThrAspAlaProGlySerThrThrAlaSerTyrThrLeu	587
1847	AAACCTTTAAATCTCTTATATATGACACATCTCTCGAAGTACAGTCTTATATACATA	1912
586	ValAsnAspIleAspLeuValIleThrAlaProAsnGlyGlnLysTyrValGlyAsnAspPheSer	587
1913	CTTAATCATTTAGATCTAGTTATTTACTGCTCGGAATCGACAAAATATATGACAAATCATTTTACT	1978

第 1 図 Y 酵素遺伝子 塩基配列とアミノ酸配列 (その4)

588	TyrProTyrAspAsnAsnTrpAspGlyArgAsnAsnValGlnAsnValIlePheIleAsnAlaProGln	609
1979	TATCTTATGATATATTAAGTGGCATGGTCCCAACAAATGTTGACAGAACCTATTTATTAAGCGCTCCCA	2044
610	SerGlyThrTyrIleIleGluValGlnAlaTyrAsnValIleProSerGlyProGlnArgPheSerLeu	631
2045	TCTCGAAGCTATATATTAAGCTTCAAGCGTATAATGTACCATCTCGCCCAAGAGCTTTCTCATA	2110
632	AlaIleValHis	635
2111	GCTATGCTACATTAAATTTTATTAATGACAAAAAATAAGCAATTTTCACTTACTTTTCTCAT	2178
2177	TTTCTCAAGCAATTATATTTTTCACCAAGCACTATGGAAGCTA	

第 6 図 アミラーゼ・プロモーター遺伝子の塩基配列

1	CAAGTCCACATGCTGCTGACAGCATTTATTAAGCTGAAACCAAGGCTATCATTT	60
61	GCTAACTGTATCTGACTTGACAGAGTGAAGAGACAGACAGGCTATTGATTAATATGCTA	120
121	GAAAGGCCATATGCGTTTCTTTTTCGACAAATATAGCAAAATGCTATTGTAAAA	180
181	ATTCTGATATTATACAAATATCATATGTTTTCATATGAAAGGAGGACGATCATGAAA	240
241	GATGlnLysArgLysTyrAlaArgLeuLeuProLeuLeuPheAlaLeuIlePheLeuLeu	300
301	CAACAAAGCGCTTACGCGGATTTGCTGCGCTTATTTTGGCTCATCTTCTTCTC	360
361	ProHisSerAla	37
381	CCTCATCTGCA	312



第 9 圖